

폐암 환자와 폐암 세포주를 주입한 Nude Mice에서 종양성장인자의 변화

김상범¹ · 박성달¹ · 김송명¹ · 허방²

고신대학교 의과대학 흉부외과학교실¹ · 고신대학교 의과대학 병리학교실²

Changes in Tumor Growth Factors from Lung Cancer Patient and Nude Mice Injected with Lung Cancer Cell Lines

Sang-Beum Kim¹ · Sung-Dal Park¹ · Song-Myung Kim¹ · Bang Huh²

¹Department of Thoracic & ²Cardiovascular Surgery Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background and purpose : The incidence of non-small cell lung cancer has decreased than past decades but the prevalence rate of squamous cell carcinoma is highest among the various types of lung cancer. There have been one of the most difficult problems of the medical areas because of the low rate of operative treatment by micrometastasis still. The released growth regulating factors from the tumor cells have been researching targets recently. This study is to know the changes of the tumor growth factors by examining the change of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) within plasma of nude mouse was measured after each of different quantity of cultured cell of squamous cell carcinoma was injected into pleural cavity of nude mouse in animal experiment, while comparing the values of TGF, Insulin-like growth factor and epidermal growth factor between experimental trial and clinical trial.

Method : Between June of 2006 and June of 2007 at Kosin University Hospital, 17 patients were chosen for this study where 13 of them were pathologically diagnosed of squamous cell carcinoma after initial diagnosis of lung cancer followed by radical pneumonectomy and pathologic biopsy, while 4 patients were pathologically diagnosed of benign tumor. Blood sample was collected prior to a surgery from the lung cancer patients scheduled for surgery, and the sample was cryopreserved. During surgery, dense tumor tissue without necrosis was excised in a size of 5mm³ and quickly frozen to be used for experimental tissue, whereas the tissue, which was located farthest from the lesion and deemed free of cancer cell, was to be used for control tissue. And the tissue obtained from benign tumor or normal tissue of granuloma patient was classified as a control tissue B, while the sample from malignant tissue of lung cancer was categorized as experimental tissue M. In animal experiment with 15 male nude mice without immunity, 5 subjects without cancer cell were used for control group, another 5 subjects with of 2×10^6 of cancer cell line (SW-900 G IV) injected into intrathoracic were used for experimental group I, and the other 5 subjects injected with twice quantity of cancer cell line of group I were classified as experimental group II. After breeding the subjects in the clean room for 8 weeks, blood sample was collected from their heart, and quantitative test of plasma TGF- β was performed. For the test of tumor growth factor, human TGF- β ELISA kit was used for quantitation of TGF- β_1 & β_2 , and active TM non-extraction IGF kit was for quantitation of IGF-I&II, while GE healthcare kit was used for EGF.

Results : In animal experiment, TGF- β_1 was expressed within the serum of all nude mice from control group as well experimental group I and II, where control group was at 28.49 fmol/ml while experimental group I and II were at 32.19 fmol/ml and 42.36 fmol/ml respectively. In clinical trial, TGF- β_1 was measured higher from experimental group with 40.9 fmol/ml than from control group with 28.5 fmol/ml, and TGF- β_2 was lower from experimental group with 12.3 fmol/ml than from control group with 30.3 fmol/ml, while the difference was insignificant with EGF ($p < 0.05$) where control group and experimental group were at 0.11 ng/ml and 0.12 ng/ml respectively. Moreover, TGF- β_1 was at 40.88 fmol/ml from control tissue B and at 15.55 fmol/ml from experimental tissue M, where as TGF- β_2 was at 12.31 fmol/ml

교신저자 : 김 송 명
주소 : 602-702 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 의과대학 흉부외과학교실
Tel : 051-990-6236
E mail : cksmmd@kosinmed.or.kr

from control tissue B and 23.95 fmol/ml from experimental tissue M ($p < 0.05$). TGF- β_1 within the serum of control group was at 812.4 fmol/ml before surgery and at 989.1 fmol/ml after surgery, which showed a slight amplification, while TGF- β_2 was at 16.8 fmol/ml before surgery and at 20.2 fmol/ml after surgery, exhibiting a slight increase ($p < 0.05$). Serum IGF-I was at 117.9 ng/ml before surgery and at 214.4 ng/ml after surgery, and IGF-II was at 552.8 ng/ml and 552.8 ng/ml after surgery, while EGF showed insignificant changes between before surgery at 0.67 ng/ml and after surgery at 0.74 ng/ml ($p < 0.05$). In lung cancer stage Ia,b, TGF- β_1 was decreased through surgery as it was at 972.94 mol/ml before and 866.92 mol/ml after, and TGF- β_2 was also decreased as measured at 42.40 mol/ml before surgery and 38.24 mol/ml after surgery. In stage IIIa,b, TGF- β_1 was decreased as measured at 980.31 mol/ml before surgery and at 928.18 mol/ml, while TGF- β_2 showed not much changes ($p < 0.05$). In lung cancer stage Ia,b, serum IGF-I was decreased as measured at 112.7 mol/ml before surgery and at 87.92 mol/ml after surgery, and IGF-II was also decreased as measured 468.78 ng/ml before surgery and at 358.59 ng/ml after surgery ($p < 0.05$). In stage IIIa,b, IGF-I showed not much changes, but IGF-II was at 438.31 ng/ml before surgery and 404.2 ng/ml after surgery, where EGF was not all influenced by the phase.

Conclusion : In the experiment with nude mice, TGF- β_1 was increased as the number of cancer cell was increased after injection of cancer cell. The number of cancer cell from early tumor, such as Ia,b from post-surgery clinical lung cancer patients, was reduced after the surgery, and TGF- β_1 was also reduced as the cancer cell was reduced as well. Therefore, it was believed that TGF- β_1 can be a feasible prognostic factor for early diagnosis of lung cancer at Ia,b of early phase.

Key words : lung cancer, tumor growth factors, transformed growth factor, insulin-like growth factor, epidermal growth factor

서 론

암관련 사망의 가장 높은 원인이 되고 있는 폐암은 현재까지 한국을 비롯한 세계적으로 발병률이 지속적으로 증가 추세에 있으며 다양한 방법의 치료에도 불구하고 완치가 되지 않아 중국에는 사망 하는 질병이며¹⁻³⁾, 질병의 경과 중에 뇌나 골격계 등에 전이를 일으키고 말기에 는 대부분에서 뼈에 전이를 일으키는데 척추에 가장 많이 가는 것으로 보고되고 있다⁴⁾. 전이가 잘 되는 순서로는 뼈 간 부신 그리고 뇌의 순서이다.

과거 전체 폐암의 80% 정도를 점유하고 있는 것은 비소세포 폐암종(Non-Small Cell Lung Cancer)이며 최근에는 선진국형으로 선암이 증가하는 추세에 있고 편평세포 암종은 약간씩 감소하는 경향에는 있으나⁵⁾ 지금까지는 가장 효과적인 치료방법은 초기에 외과적인 수술에 의한 절제술이다. 그러나 폐암의 치료는 첫 진단 시 이미 약 2/3의 환자가 수술 불가능한 상태에 있음을 발견 하게 된다⁶⁾. 초기이거나 II기 까지는 과감한 외과적 방법을 시도하여 수술성적이 좋을 수도 있으나 그러나 재발률이 매우 높아서 수술의 중요한 난제로 되어 있다. 제 1기 비소세포 암종에서도 조기 발견되어 수술한 경우 보고에 따라서는 5년 생존률이 58%-75% 정도 밖에 되지 않는다⁷⁾. 이렇게 생존률이 낮은 이유는 27% 정도에 달하는 높은 재발률⁸⁾과 전이⁹⁾ 그리고 2차 원발성 암으로 인한 것이라고 모든 연구자들의 일관된 결론이다.

수술성공률이 향상된 것은 사실이나 과거에 비하여 치료 실패율이 20-40% 달하는 것은 아직까지도 수술 불가능한 경우가 상당하다고 모두가 인정하는 바이며, 전체적인 5년 생존률은 최근까지도 15% 미만에 머물고 있다. 심지어 심폐기능의 부전으로 인한 문제와 고령으로 기인하는 것들로 인하여 사실상 수술적 치료 자체도 근치적 수술이 적용되어야 하지만 경우에 따라서는 제한적 절제술로 진행된다¹⁰⁾.

폐암의 진단⁵⁾이나 발암^{11,12)}과 암 억제제의 분자생물학적인 분야에서도 과거에 비하여 괄목할만한 발전을 가져 오기는 하였으나¹³⁾, 수술적인 치료법과 함께 사망률의 감소는 뚜렷하지 않다. 수술 이외 치료법으로 방사능 치료법은 수술법과 같은 국소 치료법으로서 많은 발전을 가져 왔으나 진행된 암 종의 경우에는 완치에 제한적일 것이다¹⁴⁾. 항암 화학적 치료의 경우에서도 다양한 약제의 개발과 부작용의 감소를 얻었지만 완치가 안되고 있어 결과적으로 사망에 이르게 된다¹⁵⁾. 이론적으로나 실제적으로도 암세포를 완전히 사멸시키기에는 역부족인 것이 현실이다. 편평세포암종은 폐암의 분야에서도 발생 빈도가 가장 많고 X-선에서도 비교적 잘 보이는 고형 암종이기 때문에 기본이 되며 치료법이나 기초적인 연구에 대한 근본적인 방법을 지속적으로 모색을 해야 할 시점에 있다.

여러 가지 방법의 치료법에도 불구하고 폐암의 5년 생존률의 향상에 실패하는 가장 중요한 원인으로 국소적

재발과 원격전이로 인한 재발성 폐암이며, 궁극적 원인은 국소 임파절이나 타장기의 미세전이(micrometastasis)가 될 것이다¹⁶⁾. 관습적인 임상병리 방법으로는 검출이 안되는 전이인 것이다. 국소임파절에 이미 가 있는 미세 전이는 상피 특히 단백에 대한 단클론 항체로 예민한 면역세포화학기법을 사용하면 검출 가능 할 수도 있다¹³⁾.

항암제의 감수성을 조사하거나 연구를 위해서 동물 암 종 모형이 필요하고 동소와 이소 이식법이 있으며 각각의 장단점이 있다. 1987년 McLemore 등^{17,18)}에 의해서 폐암세포주를 동소에 주입하는 방법을 처음 고안하여 발표한 이후 여러 가지 방법들이 연구되어 왔으나 아직도 종양형성에 대한 기법과 적절한 동물모형에 대한 연구가 많이 부족한 실정에 있다.

American cancer society 에서 조기 발견을 위한 무증상 고 위험군에서 개인적인 검진을 권하고 있어서 면역학적인 분자 암 표지자와 같은 새로운 방법을 다양하게 모색하고 있으며¹⁹⁾ 특히 암세포에 의한 성장인자²⁰⁾ 생산과 자가 분비 (autocrine secretion)와 부 분비성 (paracrine secretion) 성장 조절이 최근 많은 관심을 불러 일으키고 있다. 일반적으로 빠른 성장으로 전환되는 세포 즉 전환 세포(transformed cell) 들은 성장 촉진을 시킬 수 있는 polypeptides를 분비하고 동시에 기 분비한 물질들을 단백질 분해 활동을 하는 물질도 다량 생산 하게 된다. 강력한 단백질 분해 물질은 악성세포나 증식세포들과 관련이 있으므로 악성암세포들이 자가 분비하는 성장 조절인자인 형질전환성장인자(transforming growth factor- β , TGF- β)와 insulin-like growth factor(IGF)와 epidermal growth factor(EGF)를 생산 한다는 사실들이 이미 잘 알려져 있다²¹⁻²⁵⁾.

TGF- β 는 다기능을 수행하는 cytokine 이며 성장인자이다. 세포의 성장과 면역기능을 조정하며 세포외의 기질 단백질에도 작용하므로 그 자신의 기능을 수행하며 이 효과들은 섬유화와 암으로의 변화와 함께 염증성 장애에도 중요한 역할을 한다고 밝혀져 있다^{26,27)}. 또한 TGF- β 는 많은 상피세포의 증식을 수용체 작용과 함께 억제 시키는 성장 조절인자로서 그 작용은 serine/threonine 활성화에 의해 이루어 진다고 밝혀져 있다²⁸⁻³⁰⁾. 이와 함께 IGF는 기관지 상피 세포와 많은 암세포형에 대하여 특히 소세포 폐암종의 치료용으로도 이용되고 있다³¹⁾. EGF는 EGFR³²⁾과 함께 NSCLC의 세포배양에서 이미 풍부하게 발현 되고 있다는 사실들이 보고되고 있다.

저자는 편평세포암종의 세포주를 배양하여 nude mice의 흉강내에 주입하는 방법으로 종양형성을 시도 하였으며 종양형성 후 폐암과 관련있는 종양성장인자를 조사하였다. 이와함께 편평세포폐암종 환자를 대상으로 종양성장인자를 조사하여 이를 동물 실험과 비교해 보고자 한다. 성장조절인자로서의 TGF, IGF, EGF를 면역방사 분석법과 면역 효소 분석법을 이용하여 정량 분석하여 발현 정도를 비교 평가하고 관련성을 분석하여 수술 전후의 예후 인자로서의 TGF와 IGF 그리고 EGF의 변화를 검토 하고자 한다.

연구대상 및 방법

연구는 임상과 동물실험 두 단계로 나누었으며, 임상에서 폐암환자를 대상으로 하는 단계와 동물실험에서 nude mouse를 대상으로 하는 단계로 분리 하여 실행 하였다.

1. 임상 단계

2006년 6월부터 2007년 6월 까지 고신대학교 복음병원에서 폐암으로 진단된 환자로서 근치적 폐절제 수술을 받고 병리 조직학적 검사를 실시한 환자들 중 NSCLC로 확진된 13례로 첫째 단계로 하였고 AJCC 병기에 의한 분류상 병기 Ia,b 5례와 병기 IIIa,b 8례로 나누었으며 폐암의 조직학적 분류는 1997년 WHO 분류에 따랐으며 병기도 1997년도 AJCC 병기를 적용하였다. 양성종양 환자는 4례로서 모두 병리 조직학적으로 확진되었다.

폐암환자로 수술을 받은 환자를 대상으로 수술전 혈액을 채취하여 혈청을 분리하고, 수술 후 2-3일째 혈액을 재 채취하여 혈청을 분리하여 수술 전 분리한 혈청과 함께 -70°C의 냉장고에 검사 시까지 다른 검체들과 함께 보관하였다. 폐암환자의 수술 중 적출한 표본에서 괴사가 없는 밀집한 종양조직에서 피부 생검시 사용하는 5mm 구경의 생검기(biopsy punch)로써 조직절편을 5mm³ 크기로 일정량의 조직을 절취하여 액화질소 내에 실험 시기까지 냉동보관하였다 (Fig. 1). 폐암환자에서 병소에서 가장 멀리 떨어진 암이 없는 부분이라고 판단되는 부위의 조직과 또한 양성종양 혹은 육아종 환자의 정상조직을 같은 방법으로 절취, 보관하여 각각 폐암환자와 양성종양환자의 대조조직으로 사용하였다.

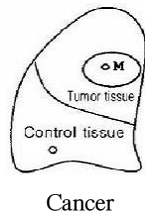


Fig. 1. The sampling sites of tumor and control tissue from surgical specimens.

2. 동물실험 단계

실험에 사용한 동물은 면역성이 없는 수컷 nude mice 15마리를 사용하여 대조군을 5마리로 하고 나머지 10마리는 실험 군으로 하였다. 실험전 nude mice의 체중은 20gm(Orient, Japan)의 범위에 있었다. 실험전 약 2주간 표준 먹이와 물을 자유롭게 공급하였으며 25° C 무균실에서 전문인에 의해 사육되었다.

본 실험에 사용한 폐암세포주(SW-900 GIV)는 폐암 중에서 악성도가 매우 높은 편평세포암종으로 한국 세포주 은행(Korean cell line bank, KCLB)에서 동결된 상태의 세포 암종은 예비로 준비해 두었으며, 배양액에서 성장시킨 세포부유액 2종류를 구입하여 사용하였다. 동결 세포주를 고체탄산가스통에서 꺼낸 후 37~40° C의 수조에 넣어 40~60초간 가온으로 녹였다. 이어 상온의 clean bench 내에서 70% 알코올 액 속에 넣어 시험관 전체를 깨끗하게 소독하였다. 폐암 세포 주(SW-900 G IV)의 배양은 세포 부유 액을 원심분리기(Hitachi 05 PR-22 Japan) 1000 RPM에 3분간 원심분리하여 배양용 용기에 넣어 37° C 5% CO₂가 공급되는 배양기(CO₂ Incubator, Jauan, France)에서 배양하였다. 이때 사용한 배양액은 RPMI 1,640 배양액(Leibovits L-15 medium)이었다.

흉강내의 주입은 배양된 암세포를 혈장이 없는 배액으로 씻은 다음 5분간 4,000rpm에서 원심 침전시켜 Trypan blue로 염색하여 암세포의 생존 여부를 사전에 확인 하였다.

90%이상으로 생존한 단세포 부유액으로 만들어 그 액을 흉강 주입용으로 하였으며 주입전까지 세포의 생존을 위해서 용기전체를 얼음위에 보관하였다. 이때 암세포의 숫자는 $2 \times 10^6/0.4\text{ml}$ 되게 하였다. 실험용 쥐 15마리 중 5마리는 암세포를 주입하지 않았으며(대조군), 5마리는 $2 \times 10^6/0.4\text{ml}$ 의 암세포를 주입하였고(I군), 나머지 5마리는 $A \times 10^6/0.4\text{ml}$ 의 암세포를 주입하였다(II군).

실험용 쥐를 ether로 전신마취하여 측와위로 위치하고 암세포를 적재한 1 ml tuberculin syringe에 30gauge의 피

하용 바늘을 달아 견갑골 하연 부위에서 액와선상에 늑골 상연을 찢어서 재빨리 주입하였다 바늘은 약 6 mm 정도만 삽입되도록 하였다. 폐암 세포주를 주입한 후 8주간의 무균실내에서 균형 식으로 성장을 관찰하면서 사육하였다(Fig. 2).

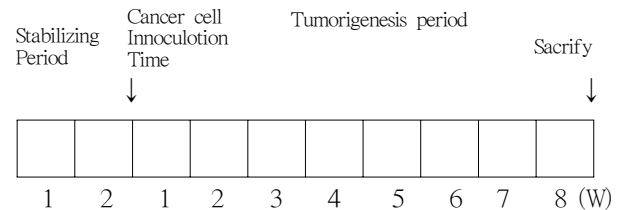


Fig 2. Schematic program of experiment.

실험이 끝난 후 ether 마취 후 동물의 심장으로부터 혈액을 최대한 많이 채취하여 헤파린이 함유된 용기에 넣어 혈액내의 분자생물학적 검사를 위하여 원심 분리 후 혈청을 냉동 보관하여 일괄적으로 정량검사를 실시하였다. 적출 조직들은 포르말린 용액 속에 넣어서 고정하였으며 일반적인 병리적인 방법으로 파라핀에 포매하여 절편을 만들고 현미경 검사를 위하여 H-E (Hematoxylin-Eosin) 염색을 실시하여 암세포의 정상적인 접종 다음에 배양 유무를 확인하였다.

3. 종양 성장인자의 검사

A) 형질전환성장인자(TGF- β) $\beta_{1,2}$ 정량검사

냉동 보관된 조직 절편을 250mg 크기로 자른 후 3ml의 homogenization buffer를 넣고 조직 마쇄기(Ultra-Turax T25, Janke & Kunkel (R) Labortechnik)을 이용하여 13,000rpm에서 5초간 마쇄시킨후, 냉동 원심 분리기(Sorvall)에 4 C에서 1시간동안 35,000 rpm으로 원심분리시킨 다음 상층액을 일정량 채취하였다. 이후 혈청은 직접 정량 검사에 임하였다.

A-1) 형질전환성장인자(TGF- β_1) β_1 의 정량검사

TGF- β_1 의 정량은 human TGF- β_1 ELISA kit(TGF- β_1 , ELASIA, Biosource Europe S.A. Belgium)을 이용한 고형상 효소 면역 분석법을 이용하였다.

검체를 Hourse radish peroxidase으로 TGF- β_1 이 부착된 microtiter plate내에 넣고 반응 시킨 후 3회 세척하고 tetramethylbenzidine (TMB) 발색 용액을 혼합하여 30분간 방치한 후 다시 세척한 다음 450nm에서 흡광도를 읽어 표준 곡선을 만들고 시료를 정량 하였다.

A-2) 형질전환성장인자(TGF- β_2) β_2 의 정량검사

TGF- β_2 의 정량은 human TGF- β_2 Kit (Human TGF- β_2 Immunoassay, Quantikine, USA)를 사용하였으며 이중 효소 면역검사 원리를 이용하였다.

검체를 TGF- β_2 단클론 항체가 부착된 미세용기에 넣고 반응시킨 후 세척과정을 거치고 TGF- β_2 에 대한 효소가 부착된 다중 클론 특이 항체를 첨가시켜 sandwich 형태를 만들도록 실온에서 2시간 방치하였다. 이후 다시 세척 후 450nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 만들고 시료를 정량하였다.

A-3) 누드 마우스의 혈장내 형질전환성장인자(TGF- β)의 측정

TGF- β_1 에 특이적인 단일 항체가 입혀져 있는 microplate에 기존 표준 물질과 검체를 well에 넣으면 존재하는 TGF- β_1 이 고정된다. TGF- β_1 이 고정된후 세척한 뒤 결합되지 않는 물질을 제거하고 TNF- β_1 에 특이적인 enzyme-linked polyclonal 항체를 넣으면 이 반응에서 TGF- β_1 은 두항체 사이에 고정된다. 이어 세척하여 enzyme 시약에 결합하지 않은 물질을 제거하고 substrate 용액을 넣어면 앞 단계에서 고정된 TGF- β_1 의 양에 비례하여 발색된다. 발색의 정도를 정지시키고 그 발색정도를 측정하였다. 검사의 원리는 Immuno sandwich법을 이용하여 정량 분석하였다.

B) Insulin-like growth factor-I,II의 정량

IGF-I,II의 정량검사는 2개의 항원으로 면역 방사 측정법(IRMA)원리¹⁰⁾를 이용하였으며 시험관 내면에 고착된 항체와 방사성 물질로 label 된 항체로 IGF-I,II와 항체들 간에 이중 복합체를 형성하도록 한 후 반응하지 못한 검체들은 세척한 후 감마 검출기로서 1분간 측정하였다. ActiveTM non-extraction IGF-I kit (Diagnostic System Lab, DSL-2800, USA)와 active non-extraction IRMA IGF_II kit (Diagnostic System Lab, DSL-2600, USA)를 각각 사용하였다.

C) EGF의 정량

EGF의 정량은 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 이용하였으며 GE healthcare Bio-Sciences사의 kit(Amersham Tumor Necrosis Factor-a, Biotrak ELISA system,USA)를 사용하였다.

4. 통계처리

수치는 평균±표준편차로 표시하였고 Mann-Whitney U 양측 검정 Spearman 순위상관과 Wilcoxon signed rank test(부호소위검정)를 적용하였고 통계학적 분석을 위하여 SPSS통계 프로그램(SPSS Version 14.0, USA)을 이용하였으며 동시에 Student T test를 하여 p값이 0.05 미만인 경우를 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 환자의 특성과 수술적 치료 방법

전체 환자는 17례로서 악성종양이 13예, 양성종양이 4예였다. 악성종양은 모두 비소세포폐암종(NSCLC) 편평세포암종(squamous cell carcinoma)만으로 최종 확진된 13례중 남자가 11례, 여자가 2례이었고 평균나이는 56±9.9세이었다. 대조군으로서 양성종양으로 확진된 4례는 남녀 각각 2례씩이었고 나이는 55.5±11.36세이었다. 모든 환자에서 수술적 치료를 시행하였으며 단순 폐엽절제술과 전폐절제술이 각각 5례이었고, 양엽 절제술이 2례와 sleeve형 폐엽절제술이 1례이었다. 양성종양 환자들 4례에서는 모두 단순 폐엽절제술을 시행하였다(Table 1, 2).

Table 1. Patients characteristics

	Benign or granuloma Lung cancer	
Number of Cases	4	13
Gender	Male	2
	Female	2
Age	55.5±11.36*	56±9.9*
Final diagnosis	Benign or granuloma	Non-small cell carcinoma
		Squamous cell carcinoma

*P>0.05

Table 2. Operative procedures in patients with benign tumor or granuloma and lung cancer

Operative. procedures		Benign tumor or granuloma	Number of cases(%)
Lobectomy	Single	4 (100)	5 (38.5)
	Sleeve		1 (7.7)
	Bilobectomy		2 (15.3)
Pneumonectomy			5 (38.5)
Total		4 (100)	13 (100)

2. 실험 쥐의 체중 변화와 폐암세포의 발생확인

실험용 누드 마우스를 처음 구입하여 무균실에서 2주간의 안정을 취한 후에 계체량은 평균 $20 \pm 0.65\text{gm}$ 이었고 8주간의 암세포 주입후의 계체량은 일률적으로 5.0gm 이 증가하여 $25 \pm 1.67\text{gm}$ 이었다.

흉강 내에 폐암 세포 주를 (SW900GIV)를 주입하여 8주간 사육한 후 ether로 전신 마취 흉강을 절개하였으며 폐암으로 추정되는 조직을 적출하여 formalin용액 내 고정 후 파라핀 포매 하여 Hematoxylin-Eosin 염색을 실시하였다. 정상적인 대조군의 alveolus와 폐조직을 확인할 수 있었으며 폐암세포주에 의하여 성장하고 있는 폐암조직이 이식되어 안착하여 성장하고 있는 것을 직접 확인할 수 있었다(Fig. 3).

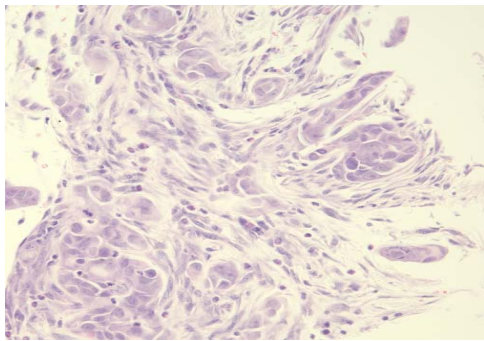


Fig. 3. Microscopic features of human lung cancer mass in mice lung tissue 8 weeks after inoculation of lung cancer cell line (HE, X400).

3. 실험쥐에 폐암 세포주의 주입에 의한 형질전환 성장인자 β_1 (TGF- β_1)의 변화

누드 마우스의 혈청내에서 대조군에서나 I군과 II군에서 형질 전환 성장 인자 β_1 의 발현은 모두에서 발현되었다. 그러나 실험쥐에 주입한 폐암 세포주의 세포수에 따라서 형질 전환 성장인자 β_1 의 발현되는 정량치는 폐암세포가 전혀 없는 대조군이 $28.49 \pm 8.58\text{ fmol/ml}$ 이었고, 폐암 세포수가 2×10^6 개를 주입한 I군에서는 $32.19 \pm 4.25\text{ fmol/ml}$ 가 나왔으며 I군 보다 2배의 폐암세포를 주입 받은 II군은 $42.36 \pm 14.45\text{ fmol/ml}$ 이었다. 주입한 세포수의 증가에 의해 형질 전환 성장인자 β_1 은 증가 하는 현상을 발견 하였다(Table 3, Fig. 4). 만약에 증례수가 많아진다면 통계학적인 유의성이 확인 될 것으로 추정된다.

Table 3. Transforming growth factor- β_1 levels in plasma of nude mice following cancer cell inoculation of each experimental group

	Control	GroupI	GroupII
Number of cases	5	5	5
Inoculation site		Intrathoracic	Intrathoracic and subcutaneous
Amount of inoculated cancer cells		$2 \times 10^6/0.4\text{ml}$	$4 \times 10^6/0.4\text{ml}$
TGF- β_1 (fmol/ml)	28.49 ± 8.58	32.19 ± 4.25	42.36 ± 14.45

TGF- β_1 : Transforming growth factor- β_1

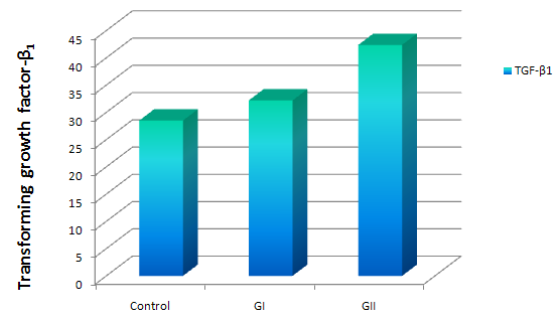


Fig. 4. Transforming growth factor- β_1 levels after inoculation of lung cancer cell lines (SW900). There are some different levels of cancer cell numbers.

4. 양성종양 환자의 대조조직과 폐암 환자의 대조 조직간에 TGF- $\beta_{1,2}$ 와 EGF의 비교

두 종류의 대조조직에서 성장인자인 TGF- $\beta_{1,2}$ 와 EGF에 대하여 비교해 보는 것은 일차적으로 암조직이 아니지만 암을 가진 환자의 조직과 악성 암이 전혀 없는 환자의 조직 간의 차이라고 할 수 있는 이러한 의미가 있을 것으로 보여서 앞서서 서로 간에 비교를 하여 보았다.

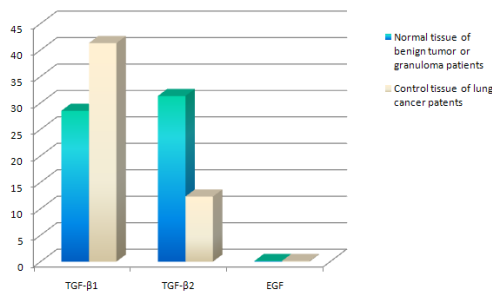
조직내의 EGF는 두 조직 간에 차이가 없었다. TGF- β_1 은 폐암환자의 대조조직에서 유의하게 12.4 fmol/ml 정도 높게 정량되었으며($P < 0.05$) TGF- β_2 는 폐암 환자의 조직에서 오히려 18 fmol/ml 정도 적게 정량 되었다. 이러한 차이는 무엇을 의미하는지를 가늠하기가 어려워서 판단을 내리기는 어렵고 또한 양성종양과 육아종 환자의 숫자가 적어서 의미를 부여 하기는 현실적으로 어려우나 TGF- β_1 과 β_2 에서 $28.5 \pm 11.17\text{ fmol/ml}$ 와 $30.3 \pm 18.28\text{ fmol/ml}$ 로써 수치가 매우 비슷하게 정량 되었다(Table 4, Fig. 5).

Table 4. Tissue levels of TGF and EGF between control tissue in patients with benign tumor or granuloma, and lung cancer patients

	Units	Benign tumor or granuloma	Control tissue of lung cancer patients
TGF	β_1 fmol/ml	28.5±11.17*	40.9±5.78*
	β_2 fmol/ml	30.3±18.28	12.3±2.08
EGF	ng/ml	0.11±0.06	0.12±0.07

* $P<0.05$ TGF- $\beta_{1,2}$: Transforming growth factor- $\beta_{1,2}$

EGF : Epidermal growth factor

Fig. 5. Comparative graph of tumor growth factors, such as TGF- $\beta_{1,2}$ and EGF between normal tissue of benign or granuloma patients and control tissue of lung cancer patients.

5. 폐암조직과 대조 폐조직 내의 형질전환 성장 인자 $\beta_{1,2}$ 의 정량치 비교

수술시 절제한 폐조직에서 대조조직이나 폐암조직 모두에서 형질 전환 성장인자가 발현 되었다. TGF- β_1 은 대조조직이 40.88 ± 21.63 fmol/ml 이었고, 폐암조직에서는 15.55 ± 16.1 fmol/ml 으로 유의하게 25.33 fmol/ml 차이가 있었다($P<0.05$). 반면에 TGF- β_2 는 대조조직에서 12.31 ± 7.8 fmol/ml 가 정량되었으나 폐암 조직에서는 23.95 ± 34.68 fmol/ml 로서 β_1 과 β_2 는 서로 상이한 소견으로 발현 되고 있었다(Table 5, Fig. 6). 앞서 양성종양, 육아조직과 폐암환자의 대조조직 간의 비교에서와는 반대의 현상이 관찰되었다.

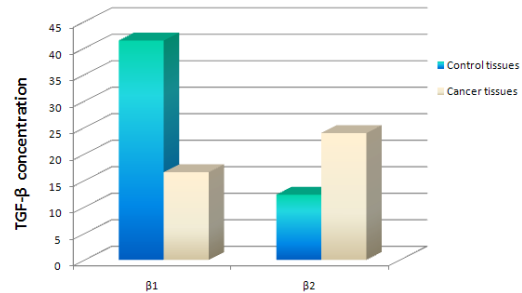
즉 암조직에서는 TGF- β_1 의 발현이 적어지는 현상 그리고 TGF- β_2 는 발현이 증가 되는 현상을 발견하였다.

Table 5. Transforming growth factors $\beta_{1,2}$ levels in control and cancer tissues

TGF-subtypes	Control tissues	Cancer tissues
β_1 (fmol/ml)	$40.88 \pm 5.78^*$	$15.55 \pm 16.1^*$
β_2 (fmol/ml)	12.31 ± 2.08	23.95 ± 34.68

* $P<0.05$

TGF : Transforming growth factor

Fig. 6. Transforming growth factor's levels in control and cancer tissue of patients. TGF- $\beta_{1,2}$ are some difference between control and cancer tissues.

6. 수술전후 양성종양 환자 혈청내의 성장 인자(TGF- $\beta_{1,2}$, IGF, EGF)의 정량

형질 전환 성장인자 TGF- $\beta_{1,2}$ 는 조직에서 보다는 혈청에서 더 높은 발현을 확인 할 수 있었다. TGF- β_1 의 경우는 수술전에 채취한 혈청에서는 812.4 ± 114.9 fmol/ml에서 수술후 989.1 ± 7.71 fmol/ml 로 약간 증가되어 있었다. 조직 내의 정량치 보다는 유의한 높은 수치를 보였다($p<0.05$). 반면에 TGF- β_2 는 수술 전에는 16.8 ± 5.73 fmol/ml 이었으나 수술 후는 20.2 ± 4.64 fmol/ml 로서 약간의 증가가 있었으며 TGF- $\beta_{1,2}$ 모두 수술후는 발현이 증가되는 현상을 보였다(Table 6, Fig. 7).

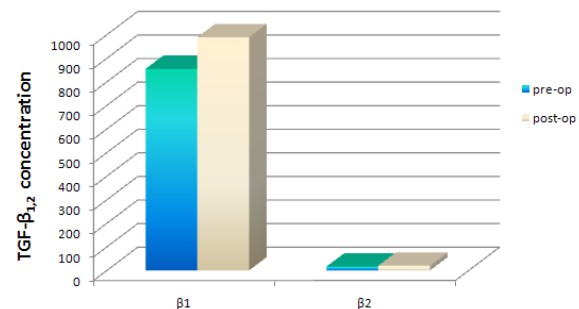
Table 6. Serum growth factor levels before and after surgery in patient with benign lesion

Growth factor			Before surgery	After surgery
TGF	β_1	(fmol/ml)	812.4±114.9*	989.1±7.71*
	β_2	(foml/ml)	16.8±5.73	20.2±4.64
IGF	I	(ng/ml)	117.9±60.1	214.4±109.61
	II	(ng/ml)	552.8±123.69	585.2±161.95
EGF		(ng/ml)	0.67±0.16	0.74±0.28

* $P<0.01$ TGF- $\beta_{1,2}$: Transforming growth factor- $\beta_{1,2}$

IGF-I,II : Insulin-like growth factor-I,II

EGF : Epidermal growth factor

Fig. 7. Transforming growth factor- $\beta_{1,2}$ levels in serum between pre-and post-operative periods of the benign tumor patients.

IGF-I는 수술전 117.9 ± 123.69 ng/ml에서 수술후 214.4 ± 109.61 ng/ml 으로 96.5 ng/ml 발현이 증가되었으며 IGF-II는 수술전 552.8 ± 123.69 ng/ml에서 수술후 585.2 ± 161.95 ng/ml 로 유사한 발현 농도를 보였다. EGF는 수술전 0.67 ± 0.16 ng/ml에서 수술후 0.74 ± 0.28 ng/ml로 큰 변동이 없었다.

7. 수술전후 폐암 병기 Ia,b 와 IIIa,b의 혈청내 형질전환 성장 인자의 정량 비교

수술전과 후에 형질전환 성장 인자는 병기 Ia,b에서 유의한 차이가 있었으며($P < 0.01$) 두병기 모두 수술 후 약간의 감소가 있었다. β_2 에서는 Ia,b에서는 42.50 ± 14.15 fmol/ml에 비해서 IIIa,b 에는 24.09 ± 15.56 fmol/ml 로서 18.41 fmol/ml 정도로 수술전에 유의한($P < 0.001$)발현의 차이가 있는 현상을 보이고 있었다. 수술후의 β_2 는 Ia,b 에는 38.24 fmol/ml 와 IIIa,b 에는 24.40 fmol/ml 로 두 병기간에도 유의한 차이가 있는 것으로 밝혀졌다($P < 0.001$).

형질 전환 성장인자는 수술전에 비하여 수술후 약간의 감소 되는 현상이 있었다.

TGF- β_1 은 병기 Ia,b의 수술전에는 972.94 ± 60.51 fmol/ml에서 866.92 ± 128.57 fmol/ml로 약 106 fmol/ml 정도 감소 하였고, 병기 IIIa,b의 경우에도 980.31 ± 55.69 fmol/ml에서 928.18 fmol/ml 52.13 fmol/ml 감소로 나타났다. 전체적으로도 73 fmol/ml정도 감소가 있었다.

TGF- β_2 에서는 병기 Ia,b에서 수술전 42.50 ± 14.15 fmol/ml에서 38.24 ± 14.71 fmol/ml 로서 4.26 fmol/ml 정도 감소 되어 있었다. 그러나 IIIa,b 에서는 변화를 보이지 않았다. 전체적으로도 의미있는 변화는 없었다(Table 7).

Table 7. Serum transforming growth factor levels before and after surgery in patients with lung cancer between stage Ia,b and IIIa,b

TGF- β Subtypes	Stage	Before surgery		After surgery	
		TGF- β_1	TGF- β_2	TGF- β_1	TGF- β_2
Ia,b		$972.94 \pm 60.51^*$	$866.92 \pm 128.57^*$	$42.50 \pm 14.15^\#$	$38.24 \pm 14.71^\S$
IIIa,b		980.31 ± 55.69	928.18 ± 130.51	$24.09 \pm 15.56^\#$	$24.40 \pm 14.58^\S$
Total		977.48 ± 55.17	904.62 ± 128.57	31.17 ± 17.17	29.72 ± 15.66

* $P < 0.01$ # $P < 0.001$ § $P < 0.001$

TGF- β : Transforming growth factor- β

8. 수술전후 폐암 병기 Ia,b와 IIIa,b의 혈청내 Insulin-like growth factor-I,II의 정량비교

성장 인자중 하나인 Insulin-like growth factor-I,II는 대체적으로 수술후 소량씩 감소 하는 추세를 보였다. IGF-I의 경우 병기 Ia,b에서는 112.7 ± 62.07 ng/ml에서 수술 후 87.92 ± 39.96 ng/ml로 25 ng/ml가 감소 하였고, IGF-II는 수술전 468.78 ng/ml에서 수술후 110 ng/ml 정도 하락한 358.59 ng/ml로 유의하게 감소하였다($P < 0.0043$).

병기 IIIa,b 에서는 IGF-I은 유의한 차이가 없었으나 IGF-II에서는 수술 전 438.31 ± 234.0 ng/ml에서 404.2 ± 173.68 ng/ml 으로 35ng/ml가 감소 하였다. 전체적으로는 IGF-I은 차이가 없었으나 IGF-II는 449.78 ± 184.62 ng/ml에서 386.59 ± 136.19 ng/ml 로 63.19 ng/ml가 감소 되어 있었다 (Table 8).

Table 8. Serum insulin-like growth factor-I,II levels before and after surgery in patients with lung cancer between stage Ia,b and IIIa,b

Stage	IGF-I (ng/ml)		IGF-II (ng/ml)	
	Before surgery	After surgery	Before surgery	After surgery
Ia,b	112.7 ± 62.07	87.92 ± 39.96	$468.78 \pm 75.78^*$	$358.59 \pm 136.19^*$
IIIa,b	114.61 ± 53.19	110.43 ± 59.86	438.31 ± 234.00	404.2 ± 173.68
Total	113.88 ± 54.18	101.77 ± 51.7	449.78 ± 184.62	386.59 ± 136.19

* $P < 0.043$

IGF-I,II : Insulin-like growth factor-I,II

9. 수술전후 폐암 병기 Ia,b 와 IIIa,b의 조직내 Epidermal growth factor 의 정량비교

Epidermal growth factor는 병기와 수술에 전혀 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Table 9).

Table 9. Serum epidermal growth factor levels before and after surgery in control and cancer tissues of lung cancer patient between stage Ia,b and IIIa,b

Stage	EGF (ng/ml)		EGF (ng/ml)	
	Control tissue	Cancer tissue	Before surgery	After surgery
Ia,b	0.10 ± 0.05	0.15 ± 0.13	0.83 ± 0.24	0.82 ± 0.29
IIIa,b	0.10 ± 0.06	0.15 ± 0.12	0.68 ± 0.31	0.80 ± 0.26
Total	0.10 ± 0.05	0.14 ± 0.12	0.74 ± 0.28	0.81 ± 0.27

EGF : Epidermal growth factor

10. 성장인자들 간의 상관관계

TGF와 IGF-I, IGF-II 그리고 EGF들 사이에는 상관 관계는 전혀 없는 것으로 독립적인 관계인 것으로 밝혀졌다.

고 찰

폐암은 환경성 발암 물질들에 노출되어 있는 대표적인 질병으로 거론되고 있으며 시대적 변천에 따라 변화를 거쳐 왔으나 그럼에도 불구하고 다른 암종 보다는 사망률에 있어서는 호전을 거부하고 있는 종양이다. 폐암에 대한 생물학적인 이해가 더욱 필요하고 여러가지의 치료 목표들을 향하여 이해하고 발전해 나가는 것이 유일한 길이라고 생각한다.

암종은 외견상 비정상적인 증식이 주된 병리 과정이며 거기에 속한 암세포는 성장인자를 생산하고 세포막에 있는 성장인자 수용체에 결합하게 되면 일련의 신호전달 과정을 통하여 자체적으로 반응하는 능력이 있고 그 결과로 자동 발생적으로 성장 및 분화를 하게 된다. 또한 세포주기(cell cycle)에 성장인자들이 필요하다는 것은 이제는 누구에게나 잘 알려진 기정사실화 되어 있다. 정상세포와 암세포의 세포 성장 증식 경로는 대체적으로 동일하며 암세포의 이상 증식은 정상 세포와 동일한 신호 전달 경로 상에 있는 단백질의 이상 기능으로 주로 기인하며 성장인자에 대한 연구는 매우 중요한 분야이다. 암 발생은 오랜 시간과 매우 복잡한 다단계의 과정에 의해 발생하기 때문에 단일한 변화 단독으로만 설명한다는 것은 불충분한 것이다. 여러 수용체와 함께 여러 성장 인자들이 활발하게 연구의 대상이 되고 있다. 최근 세포 내의 분열과 성장과정에 관여 하는 인자(cytokines)들로 알려진 것 중에 여러 종류가 있으나 저자는 대표적인 것으로 3가지 즉 TGF- β , IGF, 그리고 EGF 정도를 연구 대상으로 하였다.

폐암 조직내의 암세포들은 단일한 세포로서 이루어진 것이 아니고 이질적(heterogenous)인 여러 종류의 세포들로서 구성되어 있다. 이중에서 대부분의 암세포들은 종양형성 능력이 없고, 일부분의 줄기세포(stem cell)들만이 종양형성 능력을 가지고 있으므로 종양 세포주를 동물에 직접 주입 한다고 하여도 모두가 종양을 형성하지 못하는 것이다. 이러한 현상을 cancer stem cell theory라고 한다³³⁾. 종양형성을 확실하게 만들기 위하여 저자는 폐암 세포주의 세포수를 $2 \times 10^6/0.4$ ml 이상으로 주입하여 많은 수의 세포들을 주입함으로써 줄기세포가 최대한으로 포함 될 가능성을 증가 시킴으로써 그 성공률을 향상시키려고 한다. 또한 본 연구에 있어 동물실험과 임상상을 처음부터 계획적으로 기획한 것은 아니며 시간 간

격을 두고 결과들을 분석하는 과정에서 일관된 것 같은 결과들로 인하여 결합시키게 된 것이다.

암의 발생, 전이와 치료 등을 연구 하는데 동물 모델이 다양하게 필요하고^{34,35)} 여러 가지의 암 침윤 효소 및 억제인자들의 작용기전의 규명이나 새로운 항암제의 작용기전과 치료의 효율성에 대하여 임상적 의의를 얻는데 있어서 가장 명확한 접근 방법이 되고 있다. 초기에는 화학물질을 사용하여 발암에 대한 연구가 주로 이루어 졌으나, 이후 배양 기법의 발달로 종양 세포를 이용하여 쥐의 피하에 종양세포를 여러 가지의 방법으로 접종 시키는 방법이 간편하고 편리하게 개발되었으며 피하와 같은 heterotopic 보다는 폐암 세포주를 흉강내로 직접 주입하는 orthotopic한 발암 연구가 이루어져서 더욱 편리 하여 지게 되었다. 저자는 일반적으로 동물실험과 임상은 분리되어 있는 것이 현실이지만 동물실험과 임상연구의 결과를 직접 연관 시켜서 그 관련성을 검토 하게 되었다.

앞서 언급한 바와 같이 비소세포성 암종은 그 자체가 여러 종류의 그룹으로 이루어 져 있기 때문에 편평 세포성 암종으로만 범위를 최대한 좁혀 연구 대상으로 정하였으며 병기도 병기 Ia,b 와 IIIa,b 간의 차이만 비교 하게 된 이유는 증례가 적었던 것과 전체적으로 AJCCS의 병기 분류상 병기 II는 범위가 워낙이 제한적이라서 예수가 적게 되어 있기 때문이다. 그리고 병기의 간격이 커지면 결과의 성적에도 차이가 날 가능성이 있다는 이유이다.

저자의 검사 성적에 대하여 논하기 전에 다방면으로 참고 문헌들에 대하여 광범위하게 조사하였으나 조직에서의 성적과 혈액에서의 성적에 관한 것을 찾기가 어려워 비교 고찰이 어렵다는 것을 밝혀둔다. TGF- β 는 세포의 형질전환을 촉진하는 인자로 발견되었으나 1980년 Sporn과 Todalo²¹⁾는 Alpha 와 Beta를 발견하고 Alpha는 상피세포 성장 인자 수용체에 결합하고 EGF와 유사한 물질인 것에 반해 Beta는 새로운 형태의 증식 억제 인자로 알려져 있다. 그러나 여러 종류의 상피세포의 성장을 촉진 시키는 성장인자 라기 보다는 강력한 억제 인자이고 골아세포의 mitogen으로 작용한다는 사실이 알려져 있으며 4가지의 아형이 현재 존재 한다고 알려져 있다. 세포의 형질전환을 촉진하는 인자의 의미를 갖인 TGF- β 는 정상세포와 조직에서 분비하는 분자량 2.5kDa의 homodimer로 뼈, 혈소판, 심장, 간, 신장 등에 많이 들어 있는 증식 인자로 알려져 있으며 아형에는 현재까지 3가

지가 있는 것으로 알려져 있다. 체외에서는 대부분의 세포에서 거의 동일한 반응을 보이며 특히 세포의 증식 및 분화의 조절이나 세포외 기질의 합성에 중요한 역할을 하며 그 작용은 serine/threonine 활성화에 의해 이루어진다고 알려져 있다³⁰⁾.

Perry등³⁶⁾은 신세포암종의 실험에서 TGF- β 를 제거한 vitro 검사에서는 민감도가 거의 없었으나 in vivo에서는 암을 억제하는 모습을 보였다.

TGF- β 는 다기능 cytokines 으로 면역반응(immune response), 창상치유(wound healing), 세포접착(cellular adhesion), 세포기질축적과 분화(extracellular matrix deposition growth differentiation)에 주로 관여하고 있다. 결정적으로 중요한 악성화 과정에서 TGF 투여시 저항성의 출현 등이 있다.

정형외과 분야에서는 TGF- β 의 생물학적 여러 가지의 효과에 대하여 연구학회가 형성되어 활발하게 일하고 있는 중이기도하다. TGF, IGF와 같은 cytokine들은 세포내외의 세포막에 해당하는 각 성장 인자 수용체(receptors)들이 작용해야만이 생기능이 이루어진다. 때로는 수용체의 변이로 인하는 경우도 발생한다.

TGF- β 는 누드마우스에서는 투여한 인 형 폐암세포주에 수에 따라서 증가하는 것과 임상 폐암환자의 제 1기에서 수술후 TGF- β 가 감소하는 것은 두현상이 동일한 현상인 것으로 보인다. 좀더 진행된 병기 III에서는 저명하게 나타나지 않은 것은 이미 많은 양의 폐암 세포들이 국소 구역을 벗어나 있다고도 생각되는 부분이다.

저자의 성적에서 조직의 TGF 정량치 보다 혈액내의 정량치가 23배 이상으로 높은 이유로는 인체내의 모든 장기와 세포들이 모두 TGF를 생산하고 생 활동에 필수적인 물질이라는 것과 분화과정에서 필수적인 물질이라는 이유로 대신 설명 할 수 있다.

IGF-1은 7.6kDa으로 70개의 aminoacid peptide로 A,B,C,D,E chain으로 구성된 prohormone형태로 합성되어 있으며 IGF-II는 7.5 kDa의 분자량을 가지며 67개의 aminoacid peptide로 A,C,B,D chain으로 구성되어 있다. 구조적으로 I과 II는 insulin과 유사하며 내분비 뿐만 아니라 자가분비와 부분비의 기전으로 생 역할을 수행하며 혈액이나 체액 내에서 95%가 결합 단백질에 의하여 발견 되고 나머지 5%정도가 유리 상태로 존재하며⁽³⁷⁾ mitogen으로서 세포들의 반응이 증대된다. 특별히 수용체와 상호작용을 통해 성장 호르몬의 성장 촉진 효과를 증대한다²⁸⁾. I과 II는 유사한 물질임에는 분명하나 그 역할과 역가에

있어서는 분명히 다른 것으로 밝혀져 있다. 조직재생과 섬유화의 과정에 강력하게 관여하는 것으로 밝혀져 있으며³⁸⁾, 조혈기능에도 작용한다고 알려져 있다^{38,39)}. 저자의 결과에서는 수술 후 발현이 약간 감소하는 추세이고 IGF-II는 병기 Ia,b 에서는 유의하게 감소하였다.

EGF는 암세포의 증식과 직접 관련되어 있으며 주로 세포 외부의 EGFR에 주로 결합하고 자가분비나 부분비의 성장자극에 따라서 그 기능을 수행하며 돌연변이가 이루어진 접합체가 증식의 원인이 되기도 하고 HER2/neu oncogene의 생산물이 transmembrane 단백질이기도 하다.

임상에서 흔히 경험하고 있는 문제로서 병기가 동일한 환자들에서 각종 최신의 치료후 생존기간에 큰 차이가 나고 있음은 이들 외에도 치료결과와 예후에 미치는 다른 중요한 인자들이 있다는 것을 의미하지만 더 이상 밝혀지지 않고 있는 것이 사실이다. 저자의 연구에서 Ia,b는 초기 병기이고 IIIa,b는 진행된 병기라고 말할 수가 있다. 그러므로 초기 병기에서는 차이가 발견 할 수가 있으나 진행된 병기에서는 차이가 없는 것을 볼수 있었다. 물론 많은 예수를 조사해 보면 명확히 밝혀지겠지만 저자는 진행된 병기는 수술로서 암세포를 100% 절제가 불가능한 것과 연관된 것으로 추측케 한다.

최근 생 표지자(biomarker)의 연구가 김등과 정등^{32,40,41)}의 연구에서 cyfra21-1과 같이 발전을 하고 있으나 정등⁴¹⁾은 CTL(cytolytic T lymphocytes)를 유발 할 수 있는 항원으로 MAGE를 이용하였으나 임상에서 확정을 줄 만한 결과에는 아직 미흡한 것이 사실이다. 외과적 여러 관심사 중 하나는 수술적 치료 후에 임파선들을 절제하는 여러 가지 방법을 사용하여 광정술을 시행을 했다고는 하지만 수술이후 질병의 존재 유무를 곧바로 알 수가 없다는 것이 문제점이다. 본 연구의 결론에서 TGF- β 의 정량치가 감소하는 현상이 비록 병기가 빠른 Ia,b기간에서는 지침으로서 역할을 할수도 있다는 것이 중요점이라고 생각된다. 특히 암 수술 후에 임파선이나 타 부위로 전이 유무를 알기에는 방법상 복잡하고 시간이 너무 많이 걸리고 해결책이 없는 것이 실정이다. TGF의 경우 수술후 발현이 감소하는 현상을 적극적으로 더 연구 개발한다면 가능성이 있을 수도 있다고 생각되어 진다.

골격계는 폐, 간 다음으로 원격 전이의 타겟이다. 그 중에서도 척추가 가장 흔히 침범되며 전체 암 환자의 5-10%에서 전이가 발견되면 신경학적인 증상을 야기한다⁴²⁾. 손등은 폐암으로 인한 전이가 약 17.8%에 해당되고

평균 생존기간은 6.8개월 정도라고 하였다⁴³⁾. 전이에 있어서 폐암은 뼈에 잘 가고 골육종은 또한 폐에 전이를 일으키는 현상은 두 장기를 이루는 세포들 사이에는 혈류 이상의 긴밀한 연관성이 있을 것으로 추정 된다.

저자의 연구 결과에 의하면 TGF- β , IGF-I,II 그리고 EGF들은 상호간에 상관관계는 전혀 없는 것으로 각각 독립적으로 생각용하는 것으로 나왔다. 세포성장과 관련된 유전자들에 대하여 조사한 결과 성장촉진과 성장억제가 공존하고 있으므로 외과적인 수술과 병기에 의한 조건들에 따라 영향을 미치는 발현을 조사하였으나 그러나 여러 가지 제약점이 많으므로 추후 추가적인 검사가 더 필요하며 체계적인 보완 검사들이 많이 필요하다고 생각한다.

결 론

저자는 편평 세포성 폐암 13예와 누드 마우스에서 성장인자인 형질 전환 인자, IGF와 EGF를 암조직과 대조조직 그리고 혈액에서 정량 분석한 결과를 병기와 수술에 의한 변화들을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 누드 마우스 체내에 인형 세포주를 주입한후 8주간의 암세포를 성장 시킨 후 혈액내의 형질 전환 인자- β_1 의 정량치가 주입한 세포수에 따라 증가하는 현상이 있었다.

2. 형질 전환 인자- $\beta_{1,2}$ 는 β_1 과 β_2 간에는 상이한 차이가 있었다. β_1 에서는 폐암조직, 대조조직 그리고 양성종양의 순으로 발현량이 높아지며 폐암 조직에서 제일 낮게 발현 되고 있었다. β_2 는 대조조직, 폐암조직 그리고 양성조직의 순으로 발현량이 높아지며 폐암조직보다도 양성종양에서 발현량이 높게 나왔다.

3. 혈중 형질 전환 인자- β_1 은 조직 발현량 보다도 훨씬 많은 량이 발현되고 있었으며, 병기 Ia,b 에서는 수술전에 비하여 유의한 감소가 있었으나 IIIa,b군에서는 감소 하지는 하나 통계적인 의미 있는 감소는 아니었다. 이러한 현상은 실험쥐에서 주입한 세포주의 량에 따라서 형질 전환 인자- β_1 이 발현량이 증가하는 현상과 일맥 일치하는 현상이라고 생각된다. 형질 전환 인자- β_2 는 수술전 두 병기와 수술후의 두 병기군과의 사이에는 발현량에 유의한 차이가 있었다.

4. IGF에서는 수술후 감소 하는 추세는 I,II 모두에서 있었으며 특히 병기 Ia,b에서 IGF-II의 경우는 수술후 감

소하는 유의한 차이가 있었다.

폐암 세포주(SW900 GIV)에 의한 암 발생은 흉강 주입후 8주 만에 성장하고 있음을 확인 할 수 있었으며, 혈액내에서 TGF- β_1 유전자는 대조군에 비하여 전체적으로는 약 1.5배 정도의 증폭이 발현 되었다.

주입한 폐암 세포주의 세포수에 따라 TGF- β_1 의 정비례로 증가하는 현상을 확인 하였다.

이러한 현상은 Nude mice에서 인위적인 발암에 의한 TGF- β_1 의 증폭은 생체 치유 억제 기전이 확실히 생동하고 있다는 것을 의미 하며, 인체의 조기 폐암의 발견에 역할을 가능케 하는 정량 검사법으로 이용 할 수도 있을 것이다. 향후 실험적 발암 모델로서 연구시 반드시 고려되어야 할 부분이라고 판단되며 추후 이 부분에 대하여 보완적인 실험들이 더욱 필요 하다고 생각된다. 임상과 동물실험은 별개의 연구가 아니라 서로간의 접목이 필요한 것이라고 생각 되는 부분이다.

정상조직이나 양성조직과 수술전후의 악성종양 폐암 환자의 혈청과 조직에서 각 병기를 포함하여 모두TGF- $\beta_{1,2}$ 와 IGF-I,II 그리고 EGF도 양의 차이는 있으나 발현이 되고 있었다.

결론적으로 누드 마우스의 실험에서 주입한 폐암 세포수의 증가에 의해서 TGF- β_1 이 증가 하는 현상과 동일한 현상들이 폐암 환자에서 수술로서 IIIa,b 에서는 명확하지는 않으나 Ia,b와 같은 초기의 종양에서는 수술에 의한 세포수가 감소 할 때 성장인자들이 감소하는 것으로 추정 된다.

References

- 1) Janssen-Heijnen ML, Gatta G, Capocaccia R, Coebergh JW: Variation in survival of patients with lung cancer in Europe. EURO CARE Working Group. Euro J Cancer 34: 2191-2196, 1998
- 2) Jemal A, Murray T, Ward E, Samuel A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ: Cancer statistics. CA Cancer J Clin 55: 10-30, 2005
- 3) 통계청. 2006년 사망원인 통계결과 2007.
- 4) 김재도, 이덕희, 박정호, 손영찬, 홍영기, 손정환, 전이성 골종양의 역학적 연구. 대한 골 관절 종양 학회지 1(1): 38-44, 1995
- 5) Jang TW, Jung MH. Clinical features of the lung cancer patients who were seen in Kosin University Gospel Hospital from 1994-1998 J of Lung Cancer 7(2): 81-85, 2008
- 6) Gail MH, Eagan RT, Feld R, Ginsburg RJ: Prognostic factors in patients with resected stage I non-small lung cancer_a

- report from the Lung Cancer Study Group. 54: 1802-1813, 1984
- 7) Martini N: Surgical treatment of non-small cell lung cancer by stage. *Semin Surg Oncol* 6: 248-254, 1990
- 8) Thomas P, Rubinstein L; The Lung Cancer Study Group: Cancer recurrence after resection: T1 N0 non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 49: 242-247, 1990
- 9) Pastrino U, McCormack PM, Ginsberg RJ. A new staging proposal for pulmonary metastasis: The results of analysis of 5,206 cases of resected pulmonary metastasis. *Chest Surg Clin N Am* 8: 197-202, 1998
- 10) Mountain cF: Prognostic implications of the International Staging System for Lung Cancer. *Semin Oncol* 15(3): 236-245, 1988
- 11) American Thoracic Society: Medical section of the American Lung Association, clinical staging of primary lung cancer. *Am. Rev. Resp. Dis* 127: 659-664, 1983.
- 12) Bishop JM: Molecular theme in Oncogenesis. *Cell* 64: 235-241, 1991
- 13) Park M Vande Woude GF: Principles of molecular cell biology of cancer: Oncogenes. In DeVita VT, Jr, Hellmans, Rosenberg SA(eds): *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 3rd Ed. Philadelphia, J.B. Lippincott 945, 1989
- 14) Dorreen Ms. Role of biological markers and probes in lung carcinoma. *Clin Resp physiol* 22: 137-146, 1986
- 15) Weiden P, Piantadosi : Pre operative chemoradiotherapy in stage III non-small cell lung cancer (NSCLC): A phaseII study of the lung study group (LCSG). *Proc Am Soc Clin Oncol* 7: 197-203, 1988
- 16) Non-small cell Lung Cancer Collaborative Group, chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomized clinical trials. *BMJ* 311:899-909, 1995
- 17) Pastrino U, McCormack PM, Ginsberg RJ. A new staging proposal for pulmonary metastasis: The results of analysis of 5,206 cases of resected pulmonary metastasis. *Chest Surg Clin N Am* 8: 197-202, 1998
- 18) Fingert HT, Chen Z, Mizrahi N, Gajewski WH, Bamberg MP, Kradin RL. Rapid growth of human cancer cells in a mouse model with assay. *cancer Res* 47(14): 3824-3829, 1987
- 19) Cui ZY, Ahn JS, Lee JY, Kim WS, Lim HY, Jeon HJ, Sub SW, Kim JH, Kong WH, Kang JH, Nam DH, Park K: Mouse orthotopic lung cancer model induced by PC 14 PE 6 *Cancer Res Treat* 38(4): 234-239, 2006
- 20) Laiho M, Keski-Oja J: Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis. *A rev cancer Res* 49: 2533-2553, 1989
- 21) Sporn MB, and Todaro GJ: Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* 9(15): 878-880, 1980
- 22) Fong KM, Sekido Y, Minna JD, Molecular pathogenesis of lung cancer. *J. Thorac Cardiovasc Surg* 118(6) : 1136-1152, 1999
- 23) Bandyopadhyay A, Zhu Y, Cibull ML, Bao L, Chen C, Sun L: A soluble transforming growth factor beta type III receptor suppresses tumorigenicity and metastasis of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Cancer Res*, Oct 1;59(19): 5041-6, 1999
- 24) Hattori K, Okamoto M, Oyasu R. Carcinogenesis: Transforming growth factor beta type I receptor acts as a potent tumor suppressor in rat bladder carcinoma. *Carcinogenesis*. Oct;18(10): 1867-70, 1997
- 25) Masuda A, Knodo M, Saito T, Yatabe Y, Kobayashi T, Okamoto M, Suyama M, Takahashi T, Takahashi T: Establishment of human peripheral lung epithelial cell lines (HPL1) retaining differentiated characteristics and responsiveness to epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, and transforming growth factor beta 1. *Cancer Res*. Nov 1;57(21): 4898-904, 1997
- 26) Sun L, Chen C: Expression of transforming growth factor beta type III receptor suppresses tumorigenicity of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *J Biol Chem*. 3; 272(40): 25367-72, 1997
- 28) Williams AO, Knapton AD, Ifon ET, Saffiotti U: Transforming growth factor beta expression and transformation of rat lung epithelial cells by crystalline silica (quartz). *Int J Cancer*. 1;65(5): 639-49, 1996
- 29) Finger EC, Turley RS, Dong M, How T, Fields TA, and Blobel GC. T β RIII suppresses non-small cell lung cancer invasiveness and tumorigenicity. *Carcinogenesis* 29(3): 528-535, 2008
- 30) Btinger EP: Transgenic mice overexpressing a dominant-negative mutant type II transforming growth factor beta receptor show enhanced tumorigenesis in the mammary gland and lung in response to the carcinogen 7,12-dimethyl-[a]-anthracene. *Cancer Res* 57(24): 5564-5570, 1997
- 31) Rou GR, Darrel MW, Phillip DL, Raymond LH: Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation, *J Pediatr* 109: 408-433, 1986
- 32) 김대연, 김송명, 폐암환자의 암조각내 cyfra21-1과 epidermal growth factor receptor의 측정치에 대한 연구 대한 흉부외과학지 30: 854-861, 1997
- 33) Reya T, Morrison SJ, Clark MF, Weissman IL. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature* 414:105-111, 2001
- 34) 이동석, 김송명, 김종인, 변정훈. Subrenal capsule assay를 이용한 흰쥐와 Zucker 비만쥐에 폐암세포주이식의 효과. *고신대학교 의과대학 학술지* 20(1): 76-87, 2005
- 35) 김수현, 김종인, 이해영, 조봉균, 박성달, 김송명, 폐암세포주를 사용한 신, 비장 및 간 피막하 분석법의 비교 대한흉부외과학지 36(10): 711-720, 2003
- 36) Perry K, Wong L, Liu Victoria, Park I, Zhang Q, Rejen V, Huang X, Smith ND, Jovanovic B, Lonning S, Teicher BA, and Lee C. Treatment of transforming growth factor-Beta-insensitive mouse renca tumor by transforming growth factor- β elimination *Urology* 72: 225-229, 2008
- 37) Zapf J, Hauri C, Waldvogel M, Froesch ER. Acute metabolic effects and half-lives of intravenously administered insulin-like growth factors I and II in normal and hypophysectomized rats. *J. Clin Invest* 77: 1768-1775, 1986
- 38) Hua CC, Chang LC, Chen YC, Chang SC: Proinflammatory cytokines and fibrinolytic enzymes in tuberculous and malignant pleural effusions. *Chest* 116(5):1292-1296, 1999
- 39) Laiho M, Keski-Oja J: Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis. *A rev cancer Res* 49:2533-2553, 1989
- 40) Kim SM. Serum Carcinoembryonic Antigen in Lung Cancer

Patients. Kyungpook Univ Med J 25(3): 300-13, 1984

- 41) 정언섭, 김송명, 김종인. 폐암환자의 객담에서 melanoma autigen gene (MAGE)과 synovial sarcoma on X chromosome(SSX)의 발현. 고신대학교 의과대학 학술지 23(2): 16-23, 2008
- 42) Gilbert RW, Kim JH, and Ponser JB: Epidural spinal cord compression from metastatic tumor. Diagnosis and treatment. Ann. Neurol 3: 40-51, 1978
- 43) 손성근, 김재도, 이종철, 홍영기, 척추전이암에 대한 임상적 고찰, 대한정형외과학회지23(4): 1087-1096, 1988